

**TRANSACTION**  
**PATENT COOPERATION TREATY**

**PCT**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

(PCT Article 36 and Rule 70)

2

|   |   |  |
|---|---|--|
| Applicant's or agent's file reference<br><br>BET 95/704                                       | <b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) |  |
| International application No.<br>PCT/FR 95/01495  | International filing date (day/month/year)<br>14/11/1995  | Priority date (day/month/year)<br>14/11/1994 |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br><br>A61K9/127 |   |  |
| Applicant<br><b>PASTEUR MERIEUX SERUMS &amp; VACCINS et al.</b>                               |   |  |

|  |  |
|--|--|
| <p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>9</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>  |  |
| <p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priority</li> <li>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of the invention</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</li> <li>VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application</li> <li>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</li> </ul> |  |

|   |   |
|---|---|
| Date of submission of the demand<br><br>07/06/1996            | Date of completion of this report<br><br>05/12/1996 |
| Name and mailing address of the IPEA/ EP<br><br>Facsimile No. | Authorized officer<br><br>Telephone No.             |

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No

PCT/FR 95/01495

## 1. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *1 Replacementsheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments;*

 the international application as originally filed. the description. pages \_\_\_\_\_ . as originally filed.  
pages \_\_\_\_\_ . filed with the demand.  
pages \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_  
pages \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ the claims. Nos. \_\_\_\_\_ . as originally filed.  
Nos. \_\_\_\_\_ . as amended under Article 19.  
Nos. \_\_\_\_\_ . filed with the demand.  
Nos. \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_  
Nos. \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_ the drawings. sheets/fig. \_\_\_\_\_ . as originally filed.  
sheets/fig. \_\_\_\_\_ . filed with the demand.  
sheets/fig. \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_  
sheets/fig. \_\_\_\_\_ . filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. The amendments have resulted in the cancellation of:

 the description. pages \_\_\_\_\_  
 the claims. Nos. \_\_\_\_\_  
 the drawings. sheets/fig. \_\_\_\_\_

3.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

## 4. Additional observations, if necessary:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/FR 95/01495

**III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

the entire international application,  
 claims Nos. 21-23

because:

the said international application, or the said claims Nos. 21-23 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**International application No.  
PCT/FR 95/01495**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III

The subject matter of claims 21-23 is directed to methods for the treatment of the human or animal body by surgery or therapy. Hence, no international preliminary examination will be conducted with regard to claims 21-23 (PCT Rule 67.1(iv)). There is no single PCT criterion for determining whether claims 21-23 are industrially applicable. Patentability may also depend on the formulation of the claims. For instance, the European Patent Office does not recognise industrial applicability with regard to the subject matter of claims to the medical use of a compound. Conversely, claims directed to the first medical use of a known compound and claims directed to the use of such a compound for preparing a drug for a novel medical treatment will be accepted.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**International application No.  
PCT/FR 95/01495**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

|                               |        |           |     |
|-------------------------------|--------|-----------|-----|
| Novelty (N)                   | Claims | 1-20 & 24 | YES |
|                               | Claims |           | NO  |
| Inventive step (IS)           | Claims |           | YES |
|                               | Claims | 1-20 & 24 | NO  |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-20 & 24 | YES |
|                               | Claims |           | NO  |

**2. Citations and explanations**

1. The following documents (D) have been taken into account for the establishment of the preliminary examination report:

D1 = EP-A-0 356 339

D2 = WO-A-93/05162

2. The subject matter of claims 1, 12, 15 and 24 meets the requirements of PCT Article 33(2) in so far as none of the prior art documents cited in the international search report discloses: a) the use of an amphipathic compound including a sterol-derived lipophilic grouping bound to a cationic grouping for the production of a vaccine composition, b) the use of said amphipathic compound as an adjuvant for the delivery of said vaccine and c) a composition or product containing same.
3. The subject matter of dependent claims 2-11, 13-14 and 16-20, which defines other aspects of the invention, also comply with the requirements of PCT Article 33(2).
4. Nevertheless, the present application does not meet the criterion of PCT Article 33(3) in so far as the

4. Nevertheless, the present application does not meet the criterion of PCT Article 33(3) in so far as the subject matter of claims 1-20 and 24 does not involve an inventive step (PCT Rule 65.1, 65.2).

Document D1, which is considered the closest prior art, discloses vaccine compositions against influenza, including (cf. p. 3, l. 10-11 + l. 64-65 - p. 4, l. 5 + p. 6, l. 60 - p.11) adjuvants used to enhance the immunogenicity of said vaccine compositions (e.g. liposomes including a derivative such as DMPC/cholesterol) and hemagglutinin HA as an antigen, which only differ from the subject matter of claims 1, 12 and 15 in that the adjuvant is a sterol-derived amphipathic compound bound to cationic grouping (e.g. quaternary ammonium or protonatable amine/cholesterol).

The problem to be solved by the present invention thus appears to be that of finding adjuvants which enhance the immunogenicity of antigens administered in a vaccine composition, without any risk of toxicity (p.1, l. 24-26). The solution is provided by the subject matter of claims 1, 12, 15 and 24. But the formulation of this solution does not make any positive contribution to the inventive step in so far as, according to the description given in D2 (and mentioned by the applicant on p.3, l.10 of the present application), the amphipathic compounds, which are the same as those of the present application, also have the advantage of being an adjuvant for the incorporation of nucleic acids in cells. It would thus be obvious for a person skilled

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**International application No.  
PCT/FR 95/01495

in the art to consider the possibility of including this feature in the influenza vaccine disclosed in document D1 (see above paragraph) in order to solve the problem faced.

5. The dependent claims 2-11, 13-14 and 16-20 do not seem to contain any additional feature which, combined with the subject matter of any of the claims to which they refer, would involve an inventive step.
6. The subject matter of claims 1-20 and 24 of the present application is considered industrially applicable (PCT Article 33(4)) since the compositions of the invention must be industrially manufactured.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**International application No.  
PCT/FR 95/01495**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. Document D1 has not been cited in the description, nor has the prior art it contains been discussed. The requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii) have thus not been complied with.

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

## RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

|  |   |   |   |
|--|---|---|---|
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire<br><b>BET 95/704</b>                                 | <b>POUR SUITE A DONNER</b>  |   | Voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416) |
| Demande internationale n°<br><b>PCT/ FR 95/ 01495</b>  | Date du dépôt international<br>(jour/mois/année)<br><b>14/11/1995</b> | Date de priorité (jour/mois/année)<br><b>14/11/1994</b> |   |
| Classification internationale des brevets (CIB) ou classification nationale et CIB<br><b>A61K9/127</b> |   |   |   |
| Déposant<br><b>PASTEUR MERIEUX SERUMS &amp; VACCINS et al.</b>   |   |   |   |

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.

2. Ce RAPPORT comprend **9** feilles, y comprise la présente feuille de couverture.

Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent \_\_\_\_\_ feilles.

3. Le présent rapport contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants:

I  Base du rapport

II  Priorité

III  Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle

IV  Absence d'unité de l'invention

V  Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

VI  Certains documents cités

VII  Irrégularités dans la demande internationale

VIII  Observations relatives à la demande internationale

|  |  |
|--|--|
| Date de présentation de la demande d'examen préliminaire international<br><b>07/06/1996</b>  | Date d'achèvement du présent rapport<br><b>05.12.96</b>  |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international<br>Office Européen des Brevets<br>D-80298 Munich<br>Tel. (+ 49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d<br>Fax: (+ 49-89) 2399-4465 | Fonctionnaire autorisé<br><br>N° de Téléphone <b>8635</b> |

**RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL****I. Base du rapport**

1. Le présent rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (Les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.):

[x] de la demande internationale telle qu'initialement déposée.

[ ] de la description, pages \_\_\_\_\_, telles qu'initialement déposées,  
pages \_\_\_\_\_, déposées avec la demande d'examen  
préliminaire international,  
pages \_\_\_\_\_, déposées sous couvert d'une lettre  
du \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, déposées sous couvert d'une lettre  
du \_\_\_\_\_,

[ ] des revendications, nos. \_\_\_\_\_, telles qu'initialement déposées,  
nos. \_\_\_\_\_, telles que modifiées en vertu de  
l'article 19,  
nos. \_\_\_\_\_, déposées avec la demande d'examen  
préliminaire international,  
nos. \_\_\_\_\_, déposées sous couvert d'une lettre  
du \_\_\_\_\_,  
nos. \_\_\_\_\_, déposées sous couvert d'une lettre  
du \_\_\_\_\_,

[ ] des dessins, feuilles/fig \_\_\_\_\_, telles qu'initialement déposées,  
feuilles/fig \_\_\_\_\_, déposées avec la demande d'examen  
préliminaire international,  
feuilles/fig \_\_\_\_\_, déposées sous couvert d'une lettre  
du \_\_\_\_\_,  
feuilles/fig \_\_\_\_\_, déposées sous couvert d'une lettre  
du \_\_\_\_\_,

**2. Les modifications ont entraîné l'annulation**

[ ] de la description, pages \_\_\_\_\_.

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

[ ] des revendications, nos. \_\_\_\_\_.

[ ] des dessins, feuilles/fig. \_\_\_\_\_.

3. [ ] Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé (règle 70.2.c)).

4. Observations complémentaires, le cas échéant:

**RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL****III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle**

La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été et ne sera pas examinée pour ce qui concerne:

[ ] l'ensemble de la demande internationale,

[x] les revendications nos. 21-23 \_\_\_\_\_

parce que:

[x] la demande internationale ou les revendications nos. 21-23 \_\_\_\_\_ en question se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue d'effectuer un examen préliminaire international (préciser):

L'objet des revendications 21-23 se réfère à méthodes de traitement du corps humain ou animal par la chirurgie ou la thérapie. En conséquence, on procède pas à l'examen préliminaire international des revendications 21-23 (Règle 67.1(iv)PCT).

Il n'existe pas de critère unique dans le PCT pour déterminer si les revendications 21-23 sont susceptibles d'application industrielle. La brevetabilité peut aussi dépendre de la manière dont les revendications ont été formulées. Ainsi, l'Office Européen des brevets ne considère pas comme susceptible d'application industrielle l'objet de revendications d'utilisation d'un composé à des fins médicales. Par contre, seront acceptées des revendications relatives à un composé connu, pour une première utilisation à des fins médicales ainsi que des revendications relatives à l'utilisation d'un tel composé dans la fabrication d'un médicament en vue d'un nouveau traitement médical.

[ ] la description, les revendications ou les dessins (en indiquer les éléments ci-dessous) ou les revendications nos. \_\_\_\_\_ en question ne sont pas clairs,

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (préciser):

[ ] les revendications, ou les revendications nos. \_\_\_\_\_ en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.

[ ] il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications nos. \_\_\_\_\_ en question.

**RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

V. Déclaration motivée selon l'article 35.2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

**1. DECLARATION**

|  |                                 |     |
|--|---------------------------------|-----|
| Nouveauté                              | Revendications 1-20 et 24 _____ | OUI |
|  | Revendications _____            | NON |
| Activité inventive                     | Revendications _____            | OUI |
|  | Revendications 1-20 et 24 _____ | NON |
| Possibilité d'application industrielle | Revendications 1-20 et 24 _____ | OUI |
|  | Revendications _____            | NON |

**2. CITATIONS ET EXPLICATIONS**

1. Les documents (D) suivants ont été pris en compte pour l'établissement du rapport d'examen préliminaire:

D1 = EP-A-0 356 339  
D2 = WO-A-93/05162

2. L'objet des revendications 1, 12, 15 et 24 remplit les conditions énoncées à l'Article 33(2) PCT, car aucune des antériorités citées dans le rapport de recherche internationale ne décrit: a) l'utilisation d'un composé amphipatique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique pour la fabrication d'une composition vaccinale, b) ni l'utilisation dudit composé amphipatique comme adjuvant dans l'administration dudit vaccin, c) ni une composition ou produit le comprenant.
3. L'objet des revendications dépendantes 2-11, 13-14 et 16-20, définissant d'autres aspects de l'invention, remplissent aussi les conditions énoncées à l'Article 33

## RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(2) PCT.

4. Pourtant, la présente demande ne répond pas au critère figurant à l'Article 33(3) PCT, l'objet des revendications 1-20 et 24 n'impliquant pas d'activité inventive (Règle 65(1)(2) PCT).

Le document D1, qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche, décrit des compositions vaccinales contre l'influenza comprenant (cf. p.3, 1.10-11 + 1.64-65-p.41.5 + p.6,1.60-p.11) d'adjuvants utilisés pour augmenter l'immunogénicité desdites compositions vaccinales (par exemple liposomes comprenant un dérivé tel que le DMPC/cholestérol) et l'hémagglutinine HA comme antigène, qui ne diffère de celui qui fait l'objet des revendications 1,12 et 15 qu'en ce que l'adjuvant est un composé amphipatique dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique (par exemple, ammonium quaternaire ou amine protonable/cholestérol).

Le problème que se propose de résoudre la présente invention peut donc être considéré comme chercher d'adjuvants qui permettent d'augmenter l'immunogénicité des antigènes administrés dans une composition vaccinale, sans aucune risque de toxicité (p.1, 1.24-26). La solution est donné par l'objet des revendications 1, 12, 15 et 24. Mais aucune contribution positive à l'activité inventive ne découle de la formulation de cette solution parce que selon la description donnée dans D2 (et mentionné par le Demandeur à la p.3, 1.10 de la présente demande), les composés amphipatiques, identique à ces de la présente demande, possèdent aussi les mêmes avantages d'être un adjuvant pour l'incorporation des acides nucléiques dans les cellules. La personne du métier considérerait par conséquent que la possibilité d'incorporer cette caractéristique dans le vaccine contre la grippe décrit

**RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

dans le document D1 (voir paragraphe dessus) est évidente pour résoudre le problème posé.

5. Les revendications dépendantes 2-11, 13-14 et 16-20 ne semblent pas contenir de caractéristique supplémentaire qui, en combinaison avec l'objet de l'une quelconque des revendications dont elles dépendent, impliquerait une activité inventive.
6. L'objet des revendications 1-20 et 24 de la présente demande est considérée comme susceptible d'application industrielle (Article 33 (4) PCT) car les compositions qui sont l'objet de l'invention doivent être fabriquées industriellement.

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées:

1. Le document D1 n'a pas été cité dans la description et l'état de la technique qu'il renferme n'a pas non plus été discuté. Les dispositions de la Règle 5.1(a)(ii) PCT ne sont donc pas observées.

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Washington D.C. 20231  
United States of America

en sa qualité d'office élu

|  |   |
|--|---|
| Date d'expédition (jour/mois/année)<br>24 juin 1996 (24.06.96)               | Référence du dossier du déposant ou du mandataire<br>BET 95/704   |
| Demande internationale no<br>PCT/FR95/01495                                  | Date de priorité (jour/mois/année)<br>14 novembre 1994 (14.11.94) |
| Date du dépôt international (jour/mois/année)<br>14 novembre 1995 (14.11.95) |   |
| Déposant<br>HAENSLER, Jean etc   |   |

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

07 juin 1996 (07.06.96)

dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

\_\_\_\_\_

2. L'élection  a été faite

n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

|  |   |
|--|---|
| Bureau international de l'OMPI<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Genève 20, Suisse | Fonctionnaire autorisé<br>Beate Schmitt |
| no de télécopieur: (41-22) 740.14.36   | no de téléphone: (41-22) 730.91.11      |

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS  
✓ 1995/16

PCT

NOTIFICATION CONCERNANT LA  
TRANSMISSION DE DOCUMENTS

|   |   |
|---|---|
| Date d'expédition (jour/mois/année)<br>31 juillet 1997 (31.07.97) | Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL<br>Destinataire:<br><br>United States Patent and Trademark<br>Office<br>(Box PCT)<br>Crystal Plaza 2<br>Washington, DC 20231<br>ETATS-UNIS D'AMERIQUE<br><br>en sa qualité d'office élu |
| Demande internationale no<br>PCT/FR95/01495                       | Date du dépôt international<br>14 novembre 1995 (14.11.95)  |
| Déposant<br>PASTEUR MERIEUX SERUMS & VACCINS etc                  |   |

RECEIVED

NOV 19 1997

GROUP 1800

Le Bureau international transmet ci-joint le nombre de copies indiqué ci-après des documents suivants:

copie de la traduction en langue anglaise du rapport d'examen préliminaire international (article 36.3(a))

|  |  |
|--|--|
| Bureau international de l'OMPI<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Genève 20, Suisse<br><br>no de télécopieur: (41-22) 740.14.35 | Fonctionnaire autorisé<br>F. ZOTOMAYOR<br><br>no de téléphone: (41-22) 338.83.38 |
|--|--|



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

|   |  |  |  |
|---|--|--|--|
| (51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :<br><br>A61K 9/127, 47/28, 39/39   |  | A1   | (11) Numéro de publication internationale: <b>WO 96/14831</b><br><br>(43) Date de publication internationale: 23 mai 1996 (23.05.96) |
| <p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01495</p> <p>(22) Date de dépôt international: 14 novembre 1995 (14.11.95)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité:<br/>94/13606 14 novembre 1994 (14.11.94) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): PASTEUR MERIEUX SERUMS &amp; VACCINS [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): HAENSLER, Jean [FR/FR]; 17, rue J. Piccandet, F-69290 St Genis-les-Ollières (FR). TRANNOY, Emmanuelle [FR/FR]; 4, rue Pauline-Marie-Jaricot, F-69005 Lyon (FR). RONCO, Jorge [FR/FR]; 30, rue G. Martin Witkowski, F-69005 Lyon (FR).</p> <p>(74) Mandataires: BERNASCONI, Jean etc.; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne-d'Orves, F-75441 Paris Cédex 09 (FR).</p> |  | <p>(81) Etats désignés: AL, AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p> |  |

(54) Title: ADJUVANT FOR A VACCINE COMPOSITION

(54) Titre: ADJUVANT POUR COMPOSITION VACCINALE

(57) Abstract

An amphiphatic compound including a sterol-derived lipophilic grouping bound to a cationic grouping for use as an adjuvant in the delivery of a vaccine composition. In a particular embodiment, the lipophilic grouping is a cholesterol derivative and the cationic grouping is a quaternary ammonium or a protonatable amine. A vaccine composition including one or more antigens with at least one amphiphatic compound having a sterol-derived lipophilic grouping bound to a cationic grouping, is also disclosed.

(57) Abrégé

L'invention a pour objet un composé amphiphatique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique pour son utilisation comme adjuvant dans l'administration d'une composition vaccinale. Selon un mode particulier, le groupement lipophile est un dérivé de cholestérol et le groupement cationique est un ammonium quaternaire ou une amine protonable. L'invention concerne aussi une composition vaccinale comprenant un ou plusieurs antigènes avec au moins un composé amphiphatique possédant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique.

5

## Adjuvant pour composition vaccinale

La présente invention est relative au domaine des compositions vaccinales. Plus particulièrement, l'invention concerne de nouveaux adjuvants utilisés pour augmenter l'immunogénicité de compositions vaccinales.

10 Il existe une grande quantité d'antigènes qui, injectés chez l'animal, vont provoquer une fabrication d'anticorps qui leur sont spécifiques. Un des principes de la vaccination est de stimuler la fabrication d'anticorps par l'organisme d'un homme ou d'un animal, en lui administrant des antigènes choisis. Les anticorps ainsi fabriqués 15 permettront, ensuite, à l'organisme de se défendre contre une infection ultérieure. Cependant, certains antigènes n'entraînent pas de stimulation suffisante du système immunitaire lorsqu'ils sont administrés seuls. Il est donc nécessaire de leur adjoindre un adjuvant qui va permettre d'augmenter la réponse immunitaire de l'organisme afin 20 d'obtenir une quantité d'anticorps suffisante pour être protectrice.

20 Parmi les adjuvants connus, on peut citer l'hydroxyde d'aluminium et le phosphate d'aluminium qui sont utilisés habituellement dans les vaccins humains. Cependant, ces composés ne possèdent pas de propriété adjuvante vis-à-vis de tous les antigènes. Ils ne permettent notamment pas d'augmenter l'immunogénicité du vaccin contre la grippe.

Il est donc nécessaire de pouvoir disposer d'adjuvants qui permettent d'augmenter 25 l'immunogénicité des antigènes administrés dans une composition vaccinale, sans aucun risque de toxicité.

En outre, il est intéressant de disposer d'adjuvants capables d'induire une réponse immunitaire se traduisant par une production d'anticorps sécrétaires, tels que des IgA.

Pour atteindre ce but, l'invention propose l'utilisation d'un composé 30 amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique pour la fabrication d'une composition vaccinale.

L'invention a aussi pour objet l'utilisation d'un tel composé amphipathique comme adjuvant dans l'administration d'un vaccin.

L'invention a également pour objet une composition vaccinale comprenant au moins 35 un antigène, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un composé amphipathique possédant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique.

L'invention a encore pour objet un produit contenant au moins un antigène et un 40 composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un

5 groupement cationique , comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps en vaccination.

Un autre objet de l'invention est une méthode d'induction d'une réponse immunitaire chez un mammifère, consistant à administrer au mammifère au moins un 10 antigène, caractérisée en ce qu'elle consiste à administrer en outre au moins un composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique.

Au sens de la présente invention, le terme amphipathique désigne un composé qui 15 possède à la fois une portion hydrophobe et une portion hydrophile.

Parmi les dérivés de stérol pouvant conduire aux composés selon l'invention, on peut citer le cholestérol, le phytostérol, l'ergostérol. Les dérivés de cholestérol conviennent particulièrement bien.

20

Le groupement cationique des composés amphipathiques selon l'invention peut être constitué par un ammonium quaternaire ou une amine protonable.

25

Le groupement lipophile est relié au groupement cationique grâce à une liaison ester, éther, amide ou carbamoyle parmi lesquelles les liaisons ester, amide et carbamoyle présentent l'avantage d'être hydrolysables dans la cellule.

30

La liaison entre les 2 groupements est réalisée de préférence par l'intermédiaire d'un bras espaceur constitué par une chaîne alkylique ramifiée ou non comprenant de 1 à 20 atomes de Carbone.

Parmi les composés convenant aux fins de l'invention, on peut citer ceux mentionnés dans le brevet US 5 283 185 et notamment :

35

- l'iodure de cholestéryl- $3\beta$ -carboxamidoéthylènetriméthylammonium,
- la cholestéryl- $3\beta$ -carboxyamidoéthylénamine,
- l'iodure de cholestéryl- $3\beta$ -oxysuccinamidoéthylènetriméthylammonium,
- le  $3\beta$ -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol,
- le  $3\beta$ -[N-(polyéthylénimine)-carbamoyl]-cholestérol.

40

parmi lesquels le  $3\beta$ -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol est particulièrement avantageux.

5        Les composés amphipathiques selon l'invention peuvent être obtenus par condensation entre un dérivé de stérol et un composé à groupement cationique, selon une des méthodes décrites dans "Advanced Organic Chemistry" Part B : Reactions and Synthesis (F.A. Carey and R.J. Sundberg - Plenum Publishing Corp.). Plus particulièrement, on peut réaliser certains des composés selon l'invention selon les  
10      méthodes décrites dans le brevet US 5 283 185.

Les composés amphipathiques obtenus en solution alcoolique peuvent, ensuite, être dispersés dans de l'eau ou dans un tampon aqueux et conduire à une suspension de micelles ou de liposomes. Avantageusement, les composés amphipathiques de  
15      l'invention sont associés à un lipide neutre tel qu'un phospholipide, par exemple la dioleoyl phosphatidyléthanolamine (DOPE) ou la dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC). Cette association conduit les composés amphipathiques selon l'invention à s'organiser sous forme de liposomes plutôt que de micelles lors de la phase de dispersion dans un environnement aqueux. La proportion molaire de lipide neutre associé aux composés  
20      amphipathiques est, de préférence, supérieure à 20 %.

Les produits obtenus selon l'invention n'ont conduit à aucune réaction de toxicité aigüe lors de leur inoculation à des souris.

25       L'antigène utilisé pour induire une réponse immunitaire protectrice est constitué par n'importe quel antigène utilisé habituellement dans une composition vaccinale, que ce soit seul ou en combinaison avec un autre antigène.

30       De façon particulière, les composés amphipathiques selon l'invention se révèlent de bons immuno-adjuvants lorsqu'ils sont associés au vaccin contre le virus de la grippe qui comprend notamment : la protéine HA qui est une hémagglutinine située à la surface de l'enveloppe du virus Influenza, la protéine NP qui est une nucléoprotéine de capsid liée à l'ARN viral et une protéine M ou "matrice" protéique de l'enveloppe.

35       L'association entre l'antigène dont on veut accroître l'immunogénicité et la suspension micellaire ou liposomale de composés amphipathiques est réalisée spontanément par interaction hydrophobe et électrostatique lors du mélange des constituants.

40       Les compositions vaccinales obtenues présentent une bonne stabilité. Cependant, la suspension liposomale semble préférable à la suspension micellaire.

5 En outre, la suspension liposomale est stérilisable par filtration et lyophilisable.

Il est évident qu'il est possible d'ajouter aux compositions vaccinales obtenues des éléments utilisés classiquement dans les vaccins, tels que de l'eau, du sérum physiologique ou une substance tampon.

10

L'administration des compositions vaccinales obtenues selon l'invention peut être effectuée par toutes les voies habituellement utilisées pour l'administration de vaccins et, notamment, par voie sous-cutanée ou intranasale. Il est possible aussi de choisir pour la première immunisation et l'immunisation de rappel une voie différente.

15

Il est possible d'administrer, de façon séparée, la composition comprenant l'antigène et la composition contenant les composés amphipathiques selon l'invention ; cependant, l'administration d'une composition liposomale de composés amphipathiques selon l'invention associés à l'antigène permet non seulement d'augmenter la réponse immunitaire de type humorale, mais aussi d'induire des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques.

L'invention sera mieux comprise à la lecture des exemples non limitatifs qui suivent, en référence aux figures.

25

La figure 1 illustre le schéma de réaction de la fabrication du DC chol. Les figures 2 à 6 représentent les résultats des tests d'induction des lymphocytes T cytotoxiques pour chaque groupe de souris mentionné à l'exemple 8.

30

La figure 7 représente les résultats mentionnés à l'exemple 11.

Les figures 8 et 9 représentent les résultats mentionnés à l'exemple 12.

Les figures 10 et 11 représentent les résultats mentionnés à l'exemple 13.

35

Les figures 12 et 13 représentent les résultats mentionnés à l'exemple 14.

Les figures 14 et 15 représentent les résultats mentionnés à l'exemple 15.

40

La figure 16 représente les résultats mentionnés à l'exemple 16.

5    Exemple 1 : synthèse de  $3\beta$ -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol (DC chol)

Le DC chol est synthétisé par réaction de cholestéryl chloroformate et de N,N-diméthyléthylénediamine selon le schéma de la figure 1, ainsi que cela est décrit dans  
10 l'article de X. Gao et L. Huang (BBRC 179 (1) : 280-285).

Une solution de cholestéryl chloroformate (2,25 g, 5 mmol dans 5 ml de chloroforme sec) est ajoutée goutte à goutte à une solution en excès de N,N-diméthyléthylénediamine (2 ml, 18.2 mmol dans 3 ml de chloroforme sec) à 0°C. Après  
15 extraction du solvant par évaporation, le résidu est purifié par 2 recristallisations successives dans de l'éthanol absolu à 4°C et séché sous vide. On obtient alors 0,545 g de DC chol sous forme de poudre blanche. La structure du composé a été vérifiée par RMN et spectrométrie de masse. Les résultats obtenus sont conformes aux données publiées dans l'article cité ci-dessus.

20

Exemple 2 : Préparation d'une composition vaccinale contre le virus de la grippe, à partir d'une suspension micellaire de DC chol 2,3 mg

30 mg de DC chol obtenu selon l'exemple 1 sont dissous dans 100 µl d'éthanol.  
25 75 µl de la solution ainsi obtenue sont injectés par l'intermédiaire d'une seringue Hamilton dans 3 ml d'eau maintenue sous agitation à 45°C. Après 5 minutes d'agitation supplémentaire à 45°C, la suspension micellaire obtenue est mélangée à 200 µl du vaccin monovalent contre le virus de la grippe (souche A Singapour) comprenant notamment comme antigènes : l'hémagglutinine HA, la nucléoprotéine NP et la protéine M.

Le mélange obtenu est fractionné en doses vaccinales de 0,3 ml. Chaque dose comprend 5 µg de HA et 2,3 mg de DC chol.

35    Exemple 3 : Préparation d'une composition vaccinale contre le virus de la grippe, à partir d'une suspension micellaire de DC chol 0,45 mg

On procède comme dans l'exemple 2 en partant de 6 mg de DC chol obtenu selon l'exemple 1.

40

Exemple 4 : Préparation d'une suspension de liposomes constitués par du DC chol associé à de la dioleoyl phosphatidyléthanolamine (DOPE)

5        On mélange 18 mg de dioleoyl phosphatidyléthanolamine (DOPE) et 4,5 mg de DC chol obtenu selon l'exemple 1, que l'on met en solution dans 3 ml de chloroforme.

Le chloroforme est évaporé sous vide pour constituer un film lipidique qui est soumis à dessication sous vide, puis remis en suspension dans 3 ml d'eau.

10      Après hydratation pendant 24 heures à 4°C, la dispersion est soumise à sonication pendant 5 à 10 minutes dans un bain à ultra-sons (Laboratory Supplies - Hicksville - N.Y.) pour former des liposomes.

15      Cette suspension est stable pendant au moins 6 mois à 4°C.

**Exemple 5 : Préparation d'une suspension de liposomes constitués par du DC chol associé à de la dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC)**

20      On procède comme dans l'exemple 4 en remplaçant les 18 mg de DOPE par 18 mg de dioleoylphosphatidylcholine (DOPC).

On obtient une suspension liposomale stable pendant au moins 6 mois à 4°C.

**Exemple 6 : Préparation d'une composition vaccinale contre le virus de la grippe à partir d'une suspension liposomale DC chol/DOPE**

30      3 ml d'une suspension liposomale obtenue selon l'exemple 4 sont mélangés à 0,2 ml du vaccin grippe monovalent de la souche A/ Singapour contenant l'équivalent de 50 µg de l'antigène constitué par l'hémagglutinine HA.

Le mélange obtenu est ensuite fractionné en 10 doses vaccinales de 0,3 ml, comportant chacune 5 µg de HA et 0,45 mg de DC chol.

**Exemple 7 : Préparation d'une composition vaccinale contre le virus de la grippe à partir d'une suspension liposomale DC chol/DOPC**

35      3 ml d'une suspension liposomale obtenue selon l'exemple 5 sont mélangés à 0,2 ml du vaccin grippe monovalent de la souche A/ Singapour.

40      Le mélange obtenu est ensuite fractionné en 10 doses vaccinales de 0,3 ml comportant chacune 5 µg de HA et 0,45 mg de DC chol.

5    Exemple 8 : Immunisation

On immunise 5 groupes de 4 souris Balb/c par 3 injections sous-cutanées effectuées à J0, J21 et J36 avec les compositions vaccinales suivantes :

10       Groupe A : 0,3 ml de vaccin grippe monovalent souche A/ Singapour dilué à 5 µg de HA dans 0,3 ml de PBS,

            Groupe B : 0,3 ml de composition vaccinale obtenue selon l'exemple 2,

15       Groupe C : 0,3 ml de composition vaccinale obtenue selon l'exemple 3,

            Groupe D : 0,3 ml de composition vaccinale obtenue selon l'exemple 6,

            Groupe E : 0,3 ml de composition vaccinale obtenue selon l'exemple 7.

20

Exemple 9 : Dosage en anticorps anti-HA

Afin d'effectuer les dosages en anticorps neutralisants, on prélève les sérum de souris à J21, J36 et J51 et on effectue le titrage en anticorps anti-HA grâce à la 25 technique d'inhibition de l'hémagglutination induite par le virus de la grippe.

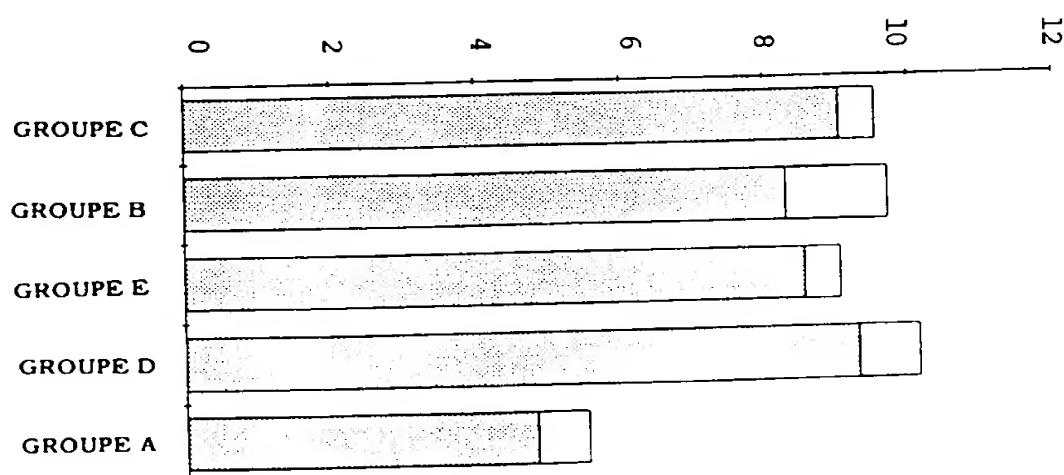
Le tableau 1 ci-dessous illustre les résultats obtenus pour chaque groupe de souris après une injection et le tableau 2 les résultats après 2 injections.

30

Tableau 1

moyenne log(2)

35



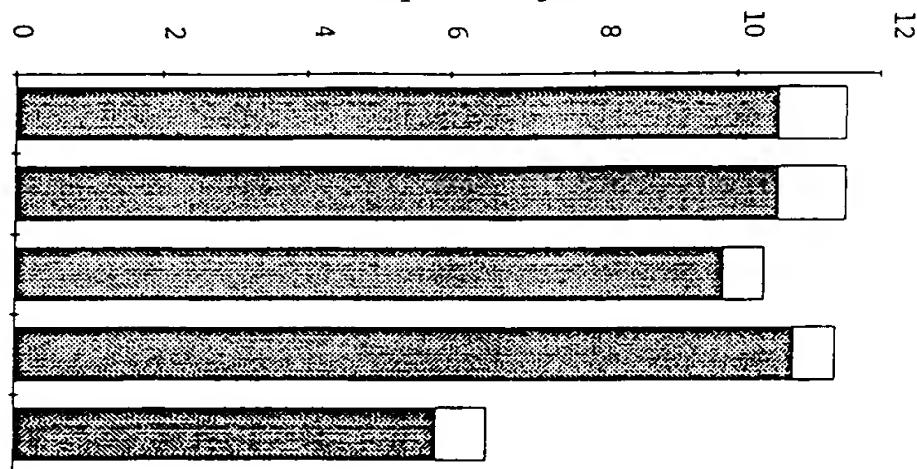
40

- 8 -

5

Tableau 2  
moyenne log(2)

10



15

Les titres d'anticorps neutralisants dans les sérums des souris sont présentés en log2 de la dilution la plus forte induisant l'inhibition de l'hémagglutination.

20

Ces résultats montrent clairement le rôle d'adjuvant joué par le DC chol. En effet, le taux d'anticorps anti-HA est nettement plus élevé pour les lots de souris ayant reçu du DC chol comparativement aux souris ayant reçu le vaccin sans adjuvant (Groupe A).

25

Il est important de noter que les taux d'anticorps neutralisants dans les groupes B, C, D et E sont supérieurs au taux d'anticorps neutralisants dans le groupe A même après une injection unique des différentes compositions vaccinales. Ces titres augmentent encore légèrement et se stabilisent après la deuxième injection. Les résultats obtenus après la 3ème injection sont sensiblement égaux à ceux de la 2ème injection (non représentés).

30

Des essais réalisés avec un vaccin grippe trivalent comprenant la souche A Texas, la souche B Panama et la souche A Beijing ont également démontré le pouvoir adjuvant du DC chol.

35

#### Exemple 10 : Mise en évidence de l'induction de cellules T cytotoxiques

40

On prélève à J51 les cellules spléniques des souris de chacun des groupes mentionnés à l'exemple 8.

Ces cellules effectrices sont restimulées *in vitro* en présence de cellules stimulantes syngéniques infectées par le virus de la souche A/ Singapour correspondant

5 au vaccin testé. La fonction cytotoxique spécifique de ces cellules stimulées est mise en évidence en utilisant comme cellules cibles la lignée de mastocytomes P815 sensibilisés par incubation avec un peptide épitope CTL de l'hémagglutinine du virus (réponse spécifique contre la HA) ou avec un peptide épitope CTL de la nucléoprotéine du virus (réponse spécifique contre la NP). La lyse non spécifique (bruit de fond) est mesurée sur  
10 des cellules P815 non sensibilisées ou sensibilisées avec un peptide épitope CTL du virus HIV (V3MN).

La lyse des cellules cibles est mesurée par une technique radioactive basée sur le chargement des cellules cibles en Cr-51 et sur le relargage de ce radioélément lors de la  
15 lyse cellulaire.

Les résultats présentés sur les figures 2 à 6 qui illustrent le pourcentage de cytotoxicité en fonction du rapport cellules effectrices sur cellules cibles pour chacun des groupes de souris testés, montrent qu'il est particulièrement avantageux d'utiliser  
20 une composition liposomale de DC chol en particulier en association avec un lipide neutre, car celle-ci permet d'induire des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques en plus de la réponse immunitaire de type humoral obtenue grâce à l'action adjuvante du DC chol.

25 **Exemple 11 : Etude de la réponse immunitaire en fonction de la dose de DCchol utilisée**

On réalise des compositions vaccinales de 300 µl comportant chacune du vaccin grippe monovalent de la souche A/Singapour et contenant soit 15 soit 5 µg de HA.  
30 associé à des liposomes de DC chol/DOPC à une concentration variable. La préparation de la suspension liposomale est réalisée de façon similaire à celle de l'exemple 4, en remplaçant les 18 mg de dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE) par 13, 5 mg de dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC) et en reprenant le film lipidique obtenu par une quantité d'eau variable selon la concentration en DC chol souhaitée.

35 On injecte les compositions vaccinales obtenues à des groupes de 5 souris Balb/c femelles de 8 à 10 semaines à J 0 et à J 28. On prélève les sérum à J 42 et on dose les Anticorps anti-HA par la technique d'inhibition de l'agglutination (IHA).

40 On teste ainsi les compositions suivantes :

- 15 µg de HA + 0 µg de DC chol
- 15 µg de HA + 400 µg de DC chol

5            - 5 µg de HA + 0 µg de DC chol  
5 µg de HA + 25 µg de DC chol  
5 µg de HA + 50 µg de DC chol  
5 µg de HA + 100 µg de DC chol  
5 µg de HA + 200 µg de DC chol  
10          5 µg de HA + 300 µg de DC chol  
5 µg de HA + 400 µg de DC chol

Les résultats exprimés en log base 2 de la dilution la plus forte induisant l'inhibition de l'hémagglutination sont représentés sur la figure 7 et montrent que ce n'est qu'au-dessus de 100 µg de DC chol/dose que l'on bénéficie du maximum de l'effet adjuvant du DC chol.

Exemple 12 : Mise en évidence de l'induction de différents isotypes d'anticorps

20          On réalise une étude comparative des anticorps induits chez 3 groupes de 5 souris adultes BALB/c, femelles de 8 à 10 semaines, ayant reçu 2 injections sous-cutanées effectuées à J 0 et J 28 avec les compositions vaccinales suivantes :

25          1er groupe : 0,3 ml de vaccin grippe monovalent souche A/Singapour dilué à 5 µg de HA dans 0,3 ml de PBS,  
2ème groupe : 0,3 ml de vaccin grippe monovalent souche A/Singapour dilué à 5 µg de HA adjuvé avec 0,1 mg d'hydroxyde d'aluminium.  
3ème groupe : 0,3 ml de composition vaccinale obtenue selon l'exemple 11 et  
30          contenant 5 µg de HA et 400 µg de DC chol associé à du DOPC.

On prélève les sérum des souris à J 28 et à J 42 et on dose par la technique ELISA les IgG1 et IgG2 produites.

35          Les résultats obtenus lors de la réponse primaire sont représentés sur la figure 8 et ceux obtenus lors de la réponse secondaire sont représentés sur la figure 9.

40          Ces résultats illustrent l'effet adjuvant du DC chol tant lors de la réponse primaire que lors de la réponse secondaire, comparativement à l'hydroxyde d'aluminium qui est un adjuvant de l'art antérieur. On remarque, en outre, la forte augmentation des IgG2a produites, ce qui signifie que le DC chol agit en favorisant le développement des lymphocytes de type TH1.

5        Exemple 13 : Mise en évidence de l'action du DC chol chez des souris âgées

On réalise exactement la même expérience qu'à l'exemple 12, mais cette fois, les souris testées sont des souris de 20 - 22 mois qu'il est plus difficile de stimuler.

10        Les résultats obtenus lors de la réponse primaire sont représentés sur la figure 10 et ceux de la réponse secondaire sur la figure 11.

Ici encore, le DC chol a un effet d'adjuvant tant pour la réponse primaire que pour la réponse secondaire et notamment vis-à-vis de l'induction d'anticorps IgG2a.

15

Exemple 14 : Taux IHA des souris adultes et des souris âgées

20        Lors des tests réalisés aux exemples 12 et 13, on détermine chez les souris immunisées les anticorps neutralisants par le test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA).

25        Les résultats obtenus lors de la réponse primaire sont illustrés sur la figure 12 et ceux de la réponse secondaire sur la figure 13. Les titres obtenus, exprimés en log base 2 de la dilution la plus forte inhibant l'hémagglutination, montrent bien le rôle adjuvant des liposomes DC chol/DOPC chez les souris adultes comme chez les souris âgées.

Exemple 15 : Immunisation par voie intranasale

30        On prépare, comme cela a été décrit à l'exemple 11, des compositions vaccinales de 50 µl cette fois, comprenant 5 µg de HA (sous forme de vaccin grippe monovalent, souche A/Singapour) combinés avec 200 µg de DC chol présents sous forme de liposomes DC chol/DOPC (dans une proportion massique de 1 pour 4).

35        On immunise par voie intranasale 2 groupes de 4 souris BALB/c deux fois à 4 semaines d'intervalle.

40        Le 1er groupe de souris (G<sub>1</sub>) reçoit 50 µl de la composition vaccinale contenant 200 µg de DC chol alors que le second groupe (G<sub>2</sub>) reçoit 50 µl du même vaccin grippe monovalent mais sans adjuvant. On analyse les réponses immunes de chaque groupe par dosage ELISA des sérums prélevés 3 semaines après l'immunisation de rappel.

- 12 -

5        Les résultats, exprimés en log base 10 du titre ELISA, sont représentés sur la figure 14 pour ce qui concerne les IgG sériques et sur la figure 15 pour ce qui concerne les IgA sériques.

10      On remarque ainsi que, dans un protocole d'administration muqueux strict, les liposomes DC chol/DOPC permettent d'augmenter les réponses immunes locales et générales d'au moins un facteur 2.

15      Le rôle adjuvant joué par les liposomes DC chol/DOPC dans les réponses immunes générales a également été observé lorsqu'au lieu de mesurer les titres IgG et IgA par ELISA, on a mesuré les titres en anticorps anti-HA par IHA ; l'augmentation de la réponse immune locale a également été observée lors d'un comptage par ELISPOT du nombre de cellules sécrétrices d'IgG et du nombre de cellules sécrétrices d'IgA dans les poumons des souris immunisées, ainsi que lors de la détermination du rapport entre le taux d'IgG (respectivement d'IgA) spécifiques et le taux d'IgG (respectivement d'IgA) totales mesurées par ELISA dans les lavages nasopharyngés des souris immunisées.

**Exemple 16 : Immunisation par administration combinée en sous-cutané et par voie intranasale**

25      On immunise 2 groupes de 4 souris BALB/c deux fois à 4 semaines d'intervalle avec, à chaque fois, les compositions vaccinales suivantes :

30      - Groupe 3 (G<sub>3</sub>) : - une composition vaccinale de 300 µl injectée en sous-cutané comprenant 4 µg de HA (sous forme de vaccin grippe monovalent souche A/Singapour) combinés avec 6 µg de DC chol (sous forme de liposomes DC chol/DOPC) et,

35      - une composition vaccinale de 50 µl administrée par voie intranasale comprenant 0,25 µg de HA (sous forme de vaccin grippe monovalent souche A/Singapour) combinés avec 6 µg de DC chol (sous forme de liposomes DC chol/DOPC),

40      - Groupe 4 (G<sub>4</sub>) : - une composition vaccinale de 300 µl injectée en sous-cutané comprenant 4 µg de HA combinés avec 200 µg de DC chol et,

        - une composition vaccinale de 50 µl administrée par voie intranasale comprenant 0,25 µg de HA combinés avec 200 µg de DC chol.

5        On prélève les sérums des souris immunisées 3 semaines après l'administration de rappel et on dose, pour chacune, le taux d'anticorps neutralisants par la technique IHA d'inhibition de l'hémagglutination.

10      Les résultats obtenus, exprimés en log base 2 du titre, sont représentés sur la figure 16 et montrent que, dans un protocole d'administration mixte combinant les voies sous-cutanée et intranasale, le DC chol a un effet adjuvant et que l'augmentation de la dose de DC chol de 6 à 200 µg permet d'accroître la réponse immunitaire.

15      Un effet dose identique a pu être observé lorsque, au lieu de mesurer le taux d'anticorps anti-HA par la technique IHA, on a mesuré les IgG sériques par la technique ELISA ou la quantité de cellules sécrétrices d'IgG et la quantité de cellules sécrétrices d'IgA dans les poumons des souris immunisées (par la technique ELISPOT), ou le rapport entre les quantités d'IgG (respectivement IgA) spécifiques et les quantités d'IgG (respectivement IgA) totales dans les lavages naso-pharyngés des souris immunisées.

20

Des résultats similaires à ceux décrits aux exemples 11 à 16 ont été obtenus en remplaçant la DOPC par de la DOPE, ainsi qu'en faisant varier le rapport DC chol/lipide neutre, en maintenant la proportion molaire de lipide neutre associé au DC chol d'au moins 20 %.

5

Revendications

1. Utilisation d'un composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique pour la fabrication d'une composition vaccinale.  
10
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le groupement lipophile est un dérivé de cholestérol.
3. Utilisation selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le groupement cationique est un ammonium quaternaire ou une amine protonable.  
15
4. Utilisation selon une des revendications précédentes caractérisée en ce que le groupement lipophile est relié au groupement cationique par une liaison ester, éther, amide ou carbamoyle.  
20
5. Utilisation selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le groupement lipophile est séparé du groupement cationique par une chaîne alkylique ramifiée ou non comprenant de 1 à 20 atomes de Carbone.  
25
6. Utilisation selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le composé amphipathique est choisi parmi les composés suivants :
  - l'iodure de cholestéryl-3 $\beta$ -carboxamidoéthylènetriméthylammonium,
  - la cholestéryl-3 $\beta$ -carboxyamidoéthylèneamine,
  - 30 - l'iodure de cholestéryl-3 $\beta$ -oxysuccinamidoéthylènetriméthylammonium,
  - le 3 $\beta$ -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol,
  - le 3 $\beta$ -[N-(polyéthylèneamine)-carbamoyl]-cholestérol.  
35
7. Utilisation de 3 $\beta$ -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]-cholestérol pour la fabrication d'une composition vaccinale.
8. Utilisation selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le composé amphipathique est associé à un lipide neutre.  
40
9. Utilisation selon la revendication 8 caractérisée, en ce que la proportion de lipide neutre associé est d'au moins 20 %.

- 5        10. Utilisation selon une des revendications 8 et 9, caractérisée en ce que le lipide neutre est la dioleoyl phosphatidyléthanolamine (DOPE) ou la dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC).
- 10        11. Utilisation selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que le composé amphipathique est dispersé dans un environnement aqueux sous forme de liposomes.
- 15        12. Utilisation comme adjuvant dans l'administration d'un vaccin d'un composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique.
- 20        13. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que ledit composé amphipathique est le  $3\beta$ -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]cholestérol.
- 25        14. Utilisation selon une des revendications 12 ou 13, caractérisée en ce que ledit composé amphipathique est associé à un lipide neutre.
- 15        15. Composition vaccinale comprenant au moins un antigène, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un composé amphipathique possédant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique.
- 30        16. Composition vaccinale selon la revendication 15, caractérisée en ce que ledit groupement lipophile est un dérivé de cholestérol.
- 35        17. Composition vaccinale selon une des revendications 15 ou 16 caractérisée en ce que ledit composé amphiphatique est le  $3\beta$ -[N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl]cholestérol.
18. Composition vaccinale selon une des revendications 15 à 17, caractérisée en ce que ledit composé amphiphathique se présente sous forme de liposomes incluant au moins un antigène.
- 40        19. Composition vaccinale selon une des revendications 15 à 18, caractérisée en ce que ledit composé amphipathique est associé à un lipide neutre.
20. Composition vaccinale selon une des revendications 15 à 19, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un antigène du virus de la grippe.

5      21. Méthode d'induction d'une réponse immunitaire chez un mammifère, consistant à administrer au mammifère au moins un antigène, caractérisée en ce qu'elle consiste à administrer en outre au moins un composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement polaire.

10     22. Méthode selon la revendication 21 caractérisée en ce que ledit composé amphiphatique est administré en même temps que l'antigène.

15     23. Méthode selon une des revendications 21 ou 22, caractérisée en ce que l'antigène est une hémagglutinine du virus de la grippe.

24. Produit contenant au moins un antigène et un composé amphipathique comprenant un groupement lipophile dérivé d'un stérol lié à un groupement cationique, comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans temps en vaccination.

1/12

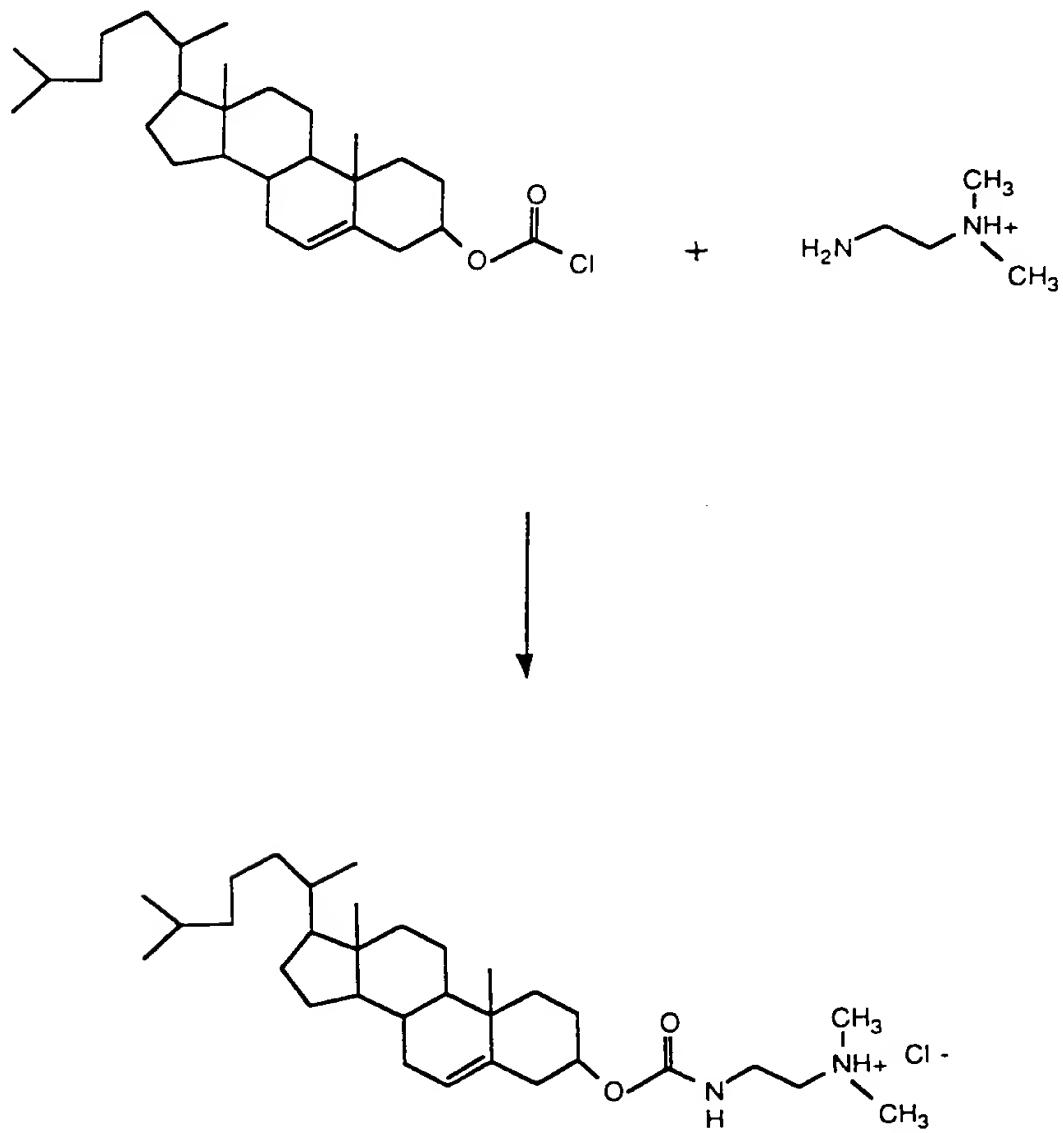
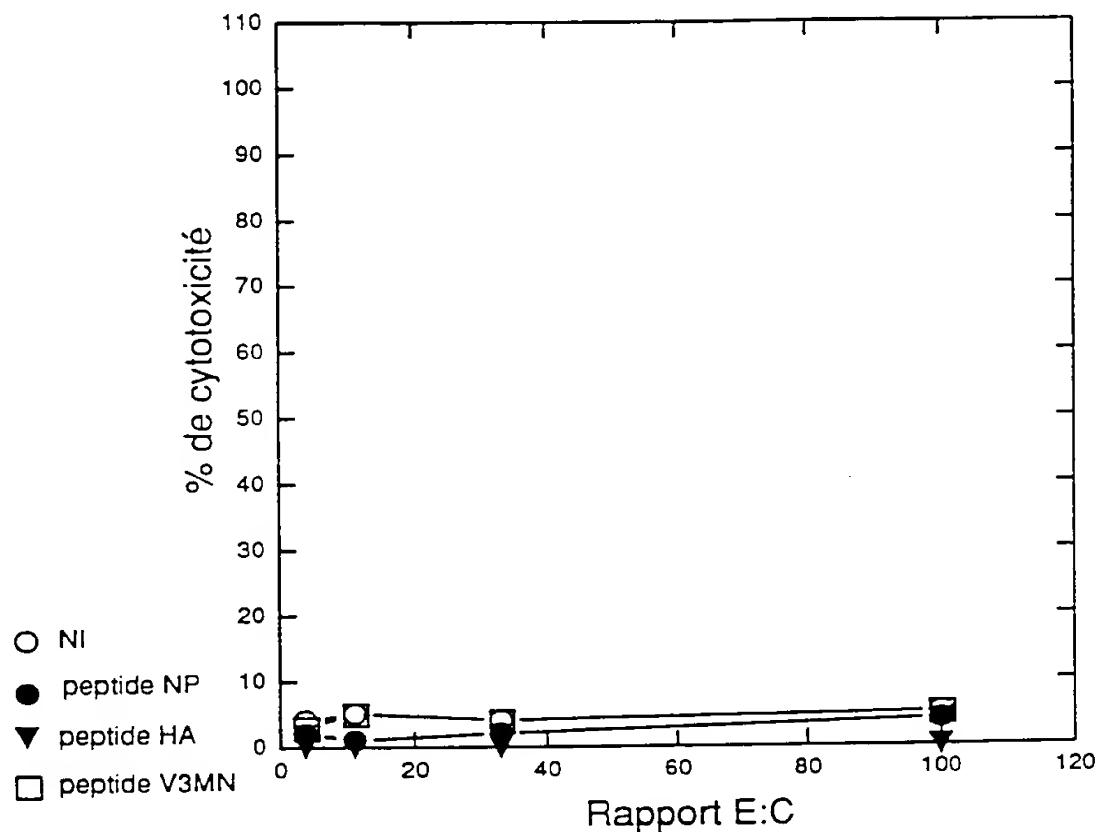


FIGURE 1

**Souris Balb/c immunisées avec du vaccin****FIGURE 2**

Souris Balb/c immunisées avec DC-CHOL 2,3mg

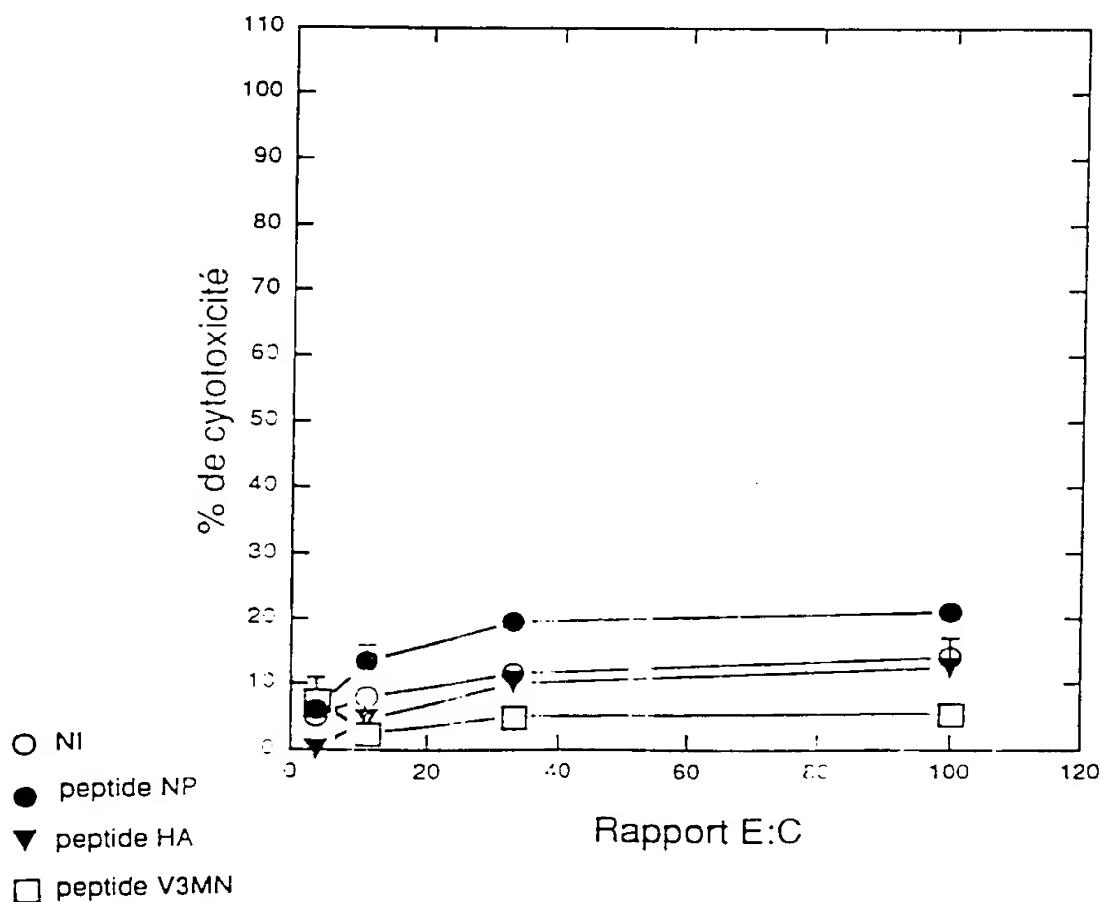
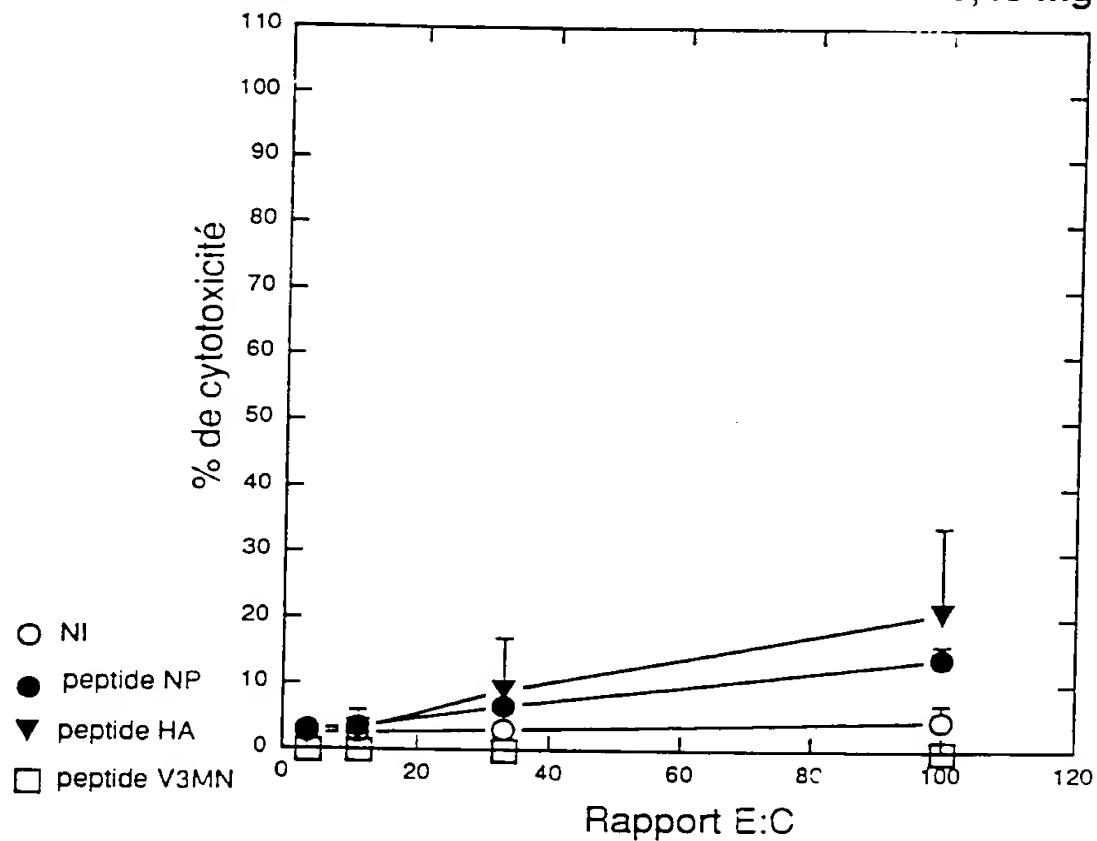
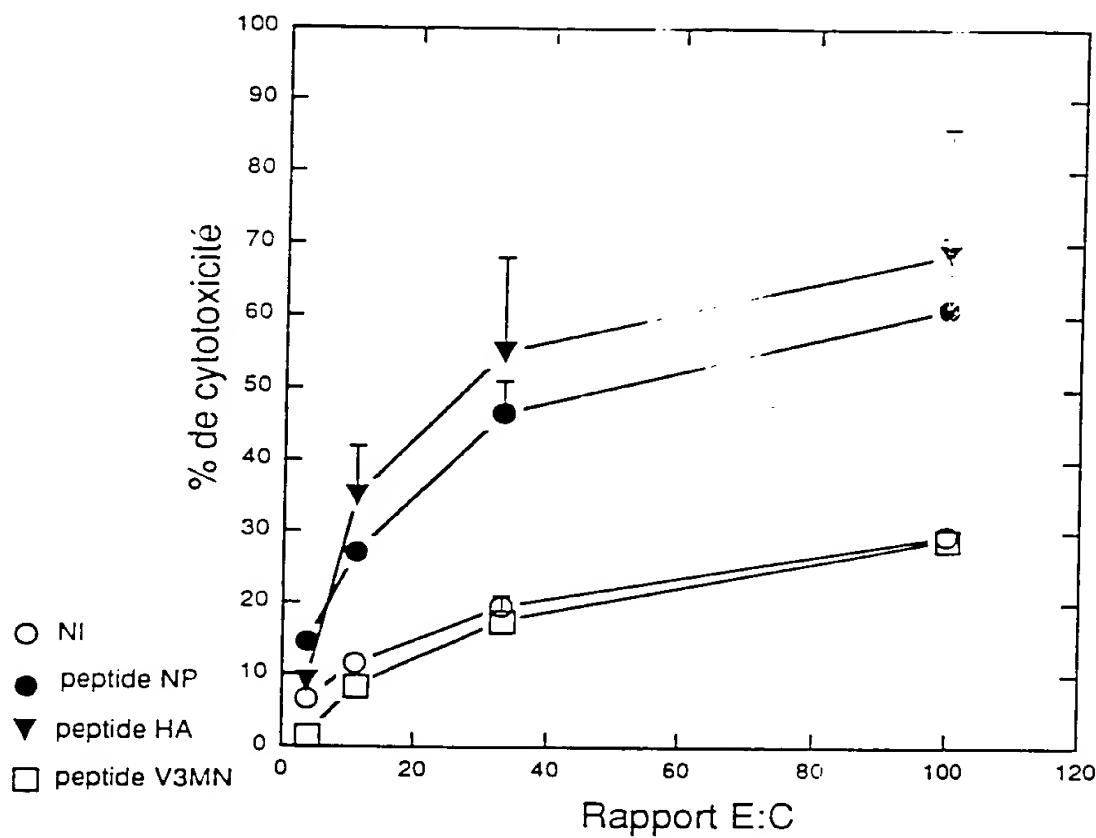
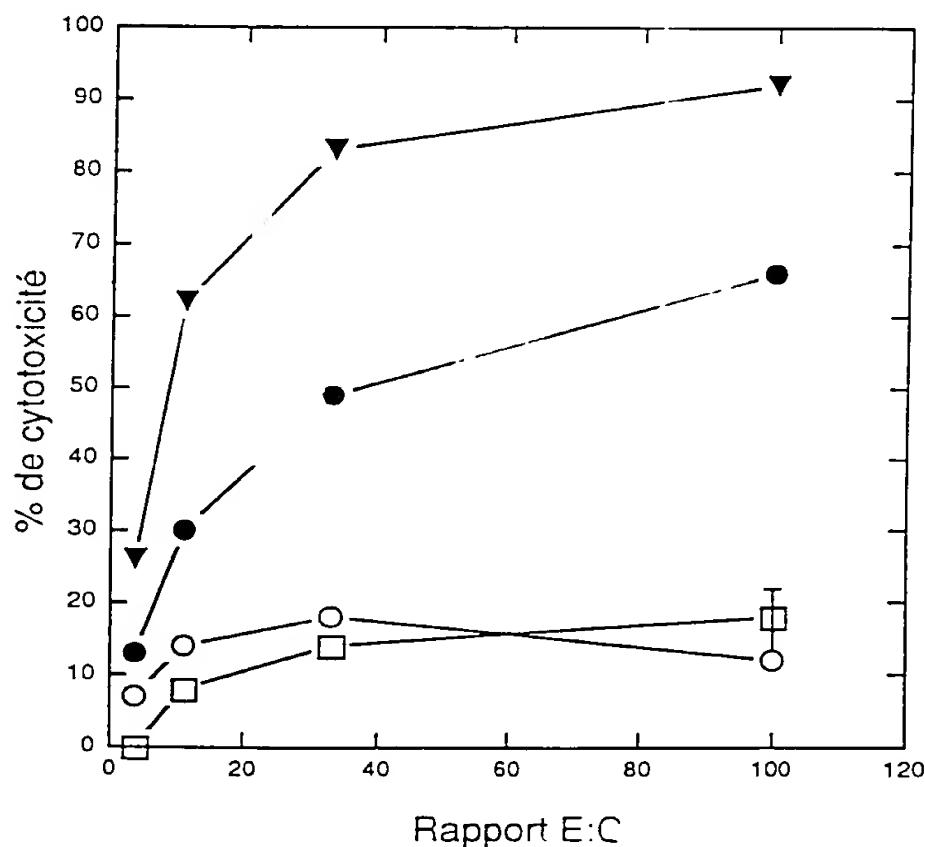


FIGURE 3

**Souris Balb/c immunisées avec DC-Chol 0,45 mg****FIGURE 4**

**Souris Balb/c immunisées avec des Liposomes- DC CHOL DOPE****FIGURE 5**

**Souris Balb/c immunisées avec des Liposomes DC CHOL- DOPC**

- NI
- peptide NP
- ▼ peptide HA
- peptide V3MN

**FIGURE 6**

7/12

## TITRE IHA

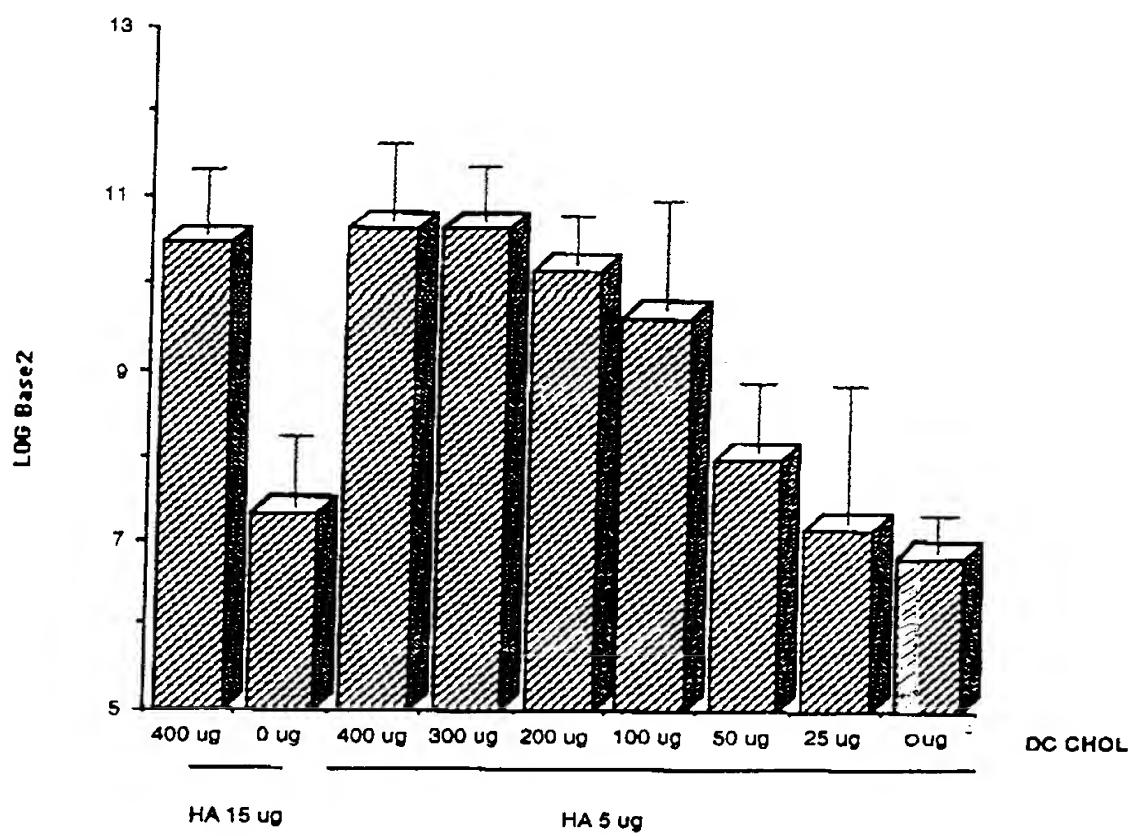


FIGURE 7

8/12

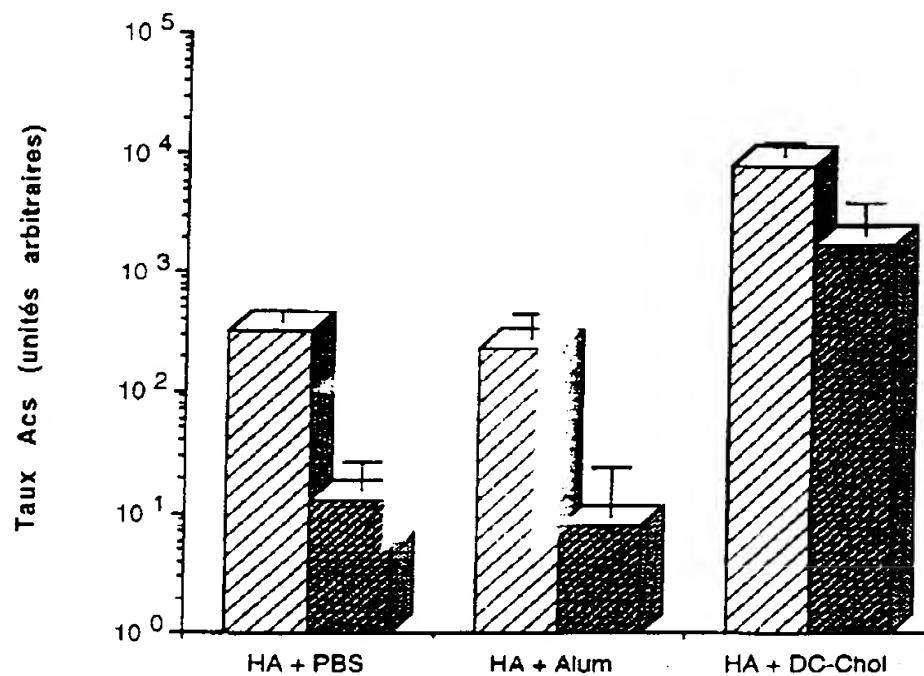


FIGURE 8

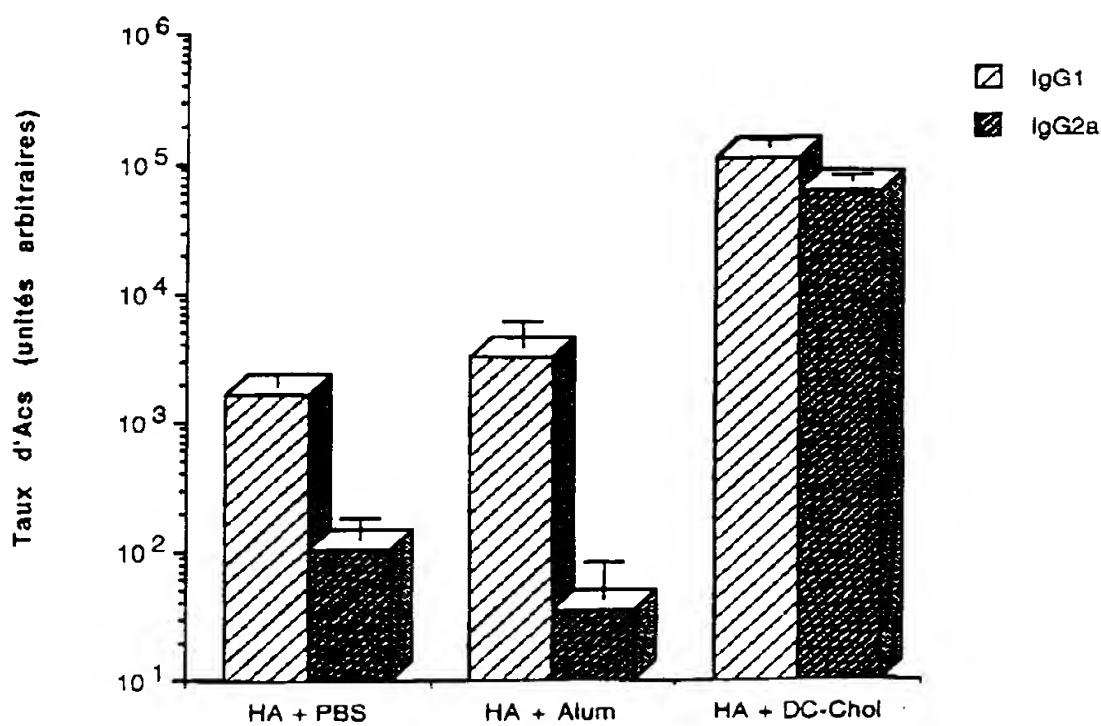


FIGURE 9

9/12

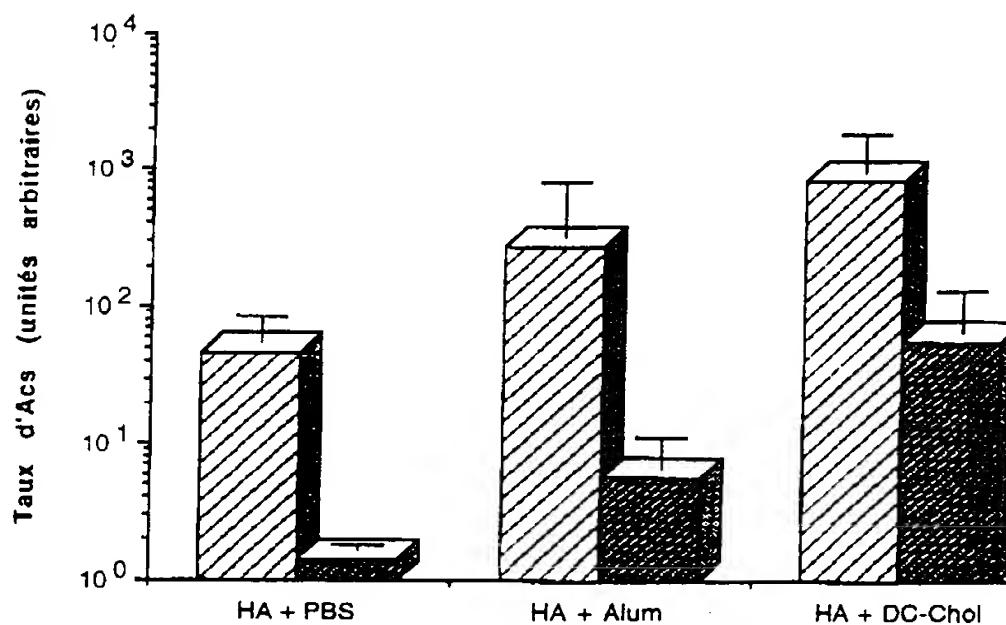


FIGURE 10

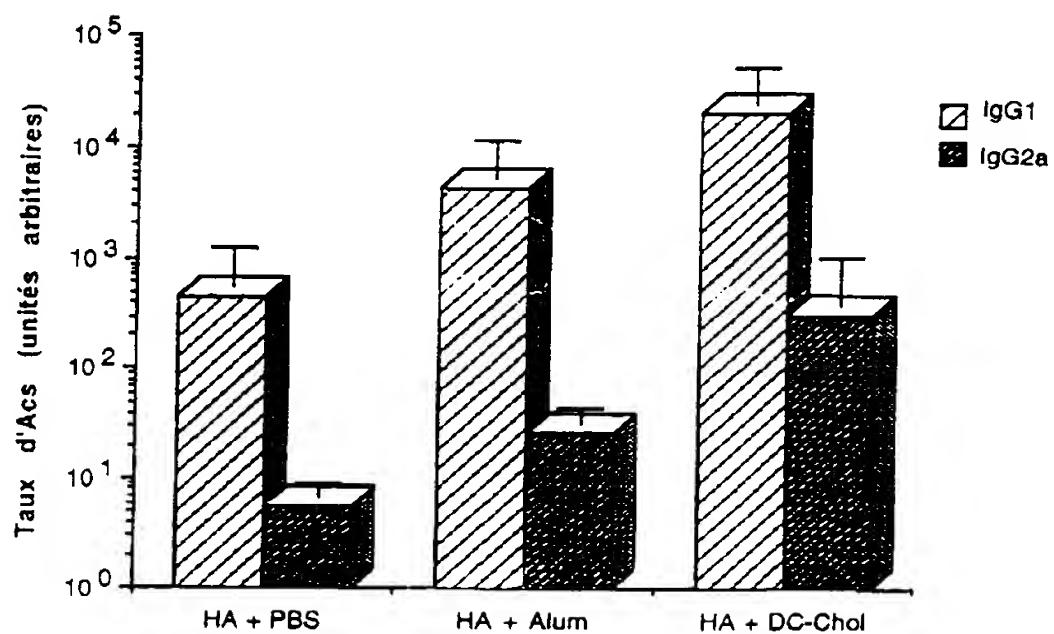


FIGURE 11

10/12

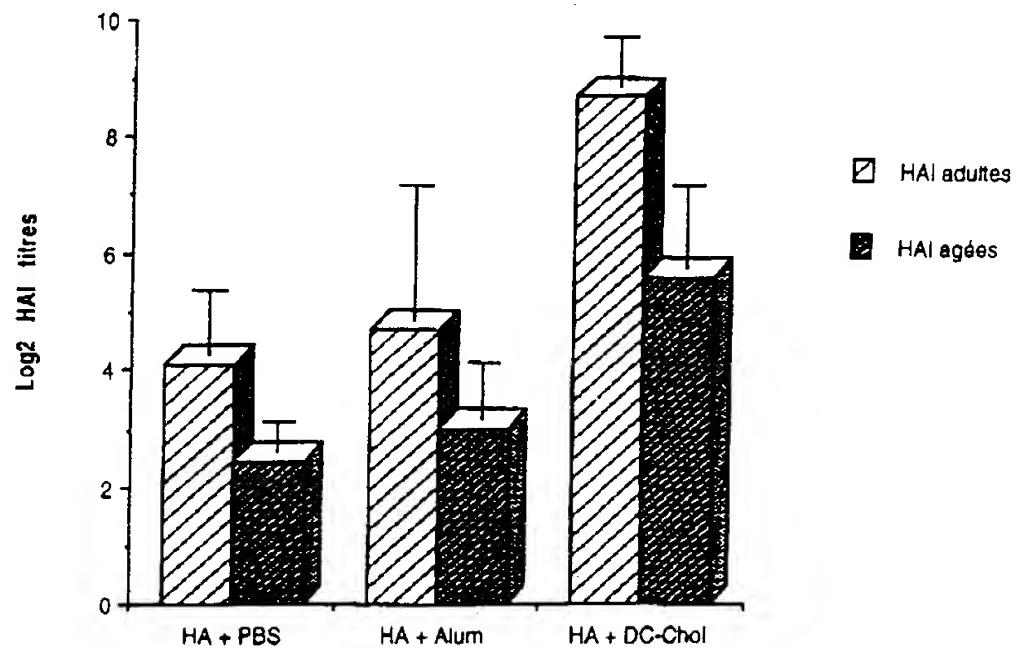


FIGURE 12

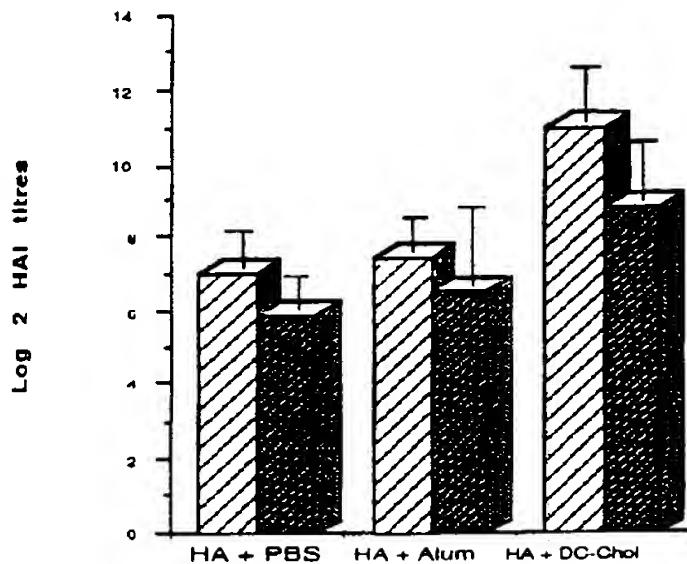


FIGURE 13

11/12

Titre ELISA IgG

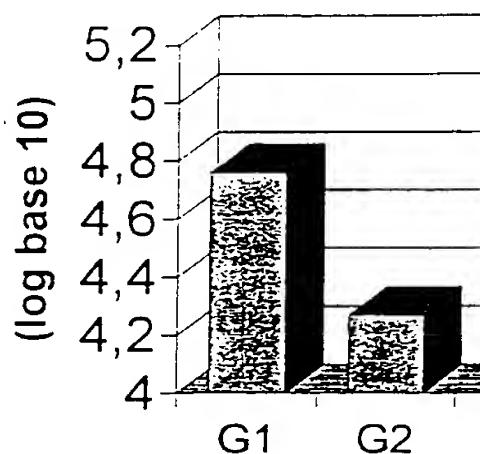


FIGURE 14

Titre ELISA IgA

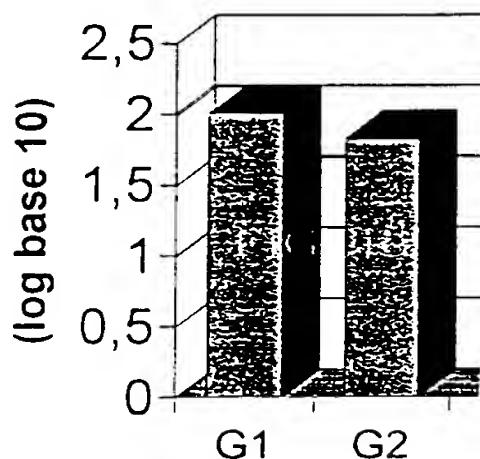


FIGURE 15

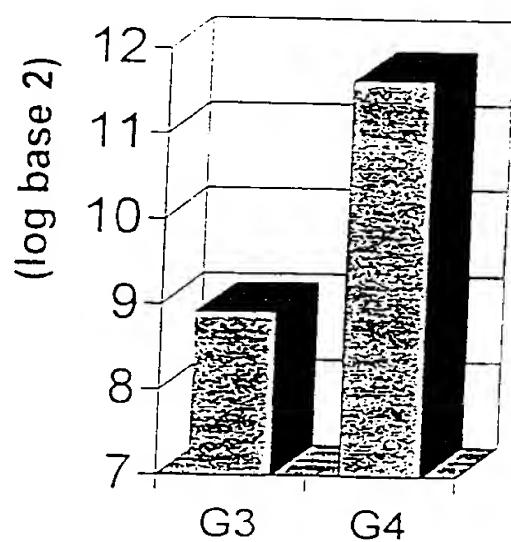
12/12  
Titre IHA

FIGURE 16

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No  
PCT/FR 95/01495

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 6 A61K9/127 A61K47/28 A61K39/39

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| Y          | WO,A,93 05162 (THE UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH CORPORATION) 18 March 1993<br>see the whole document<br>& US,A,5 283 185<br>cited in the application<br>--- | 1-24                  |
| Y          | EP,A,0 356 339 (THE LIPOSOME COMPANY, INC.) 28 February 1990<br>see page 6, line 63 - page 11, line 56<br>---<br>-/-  | 1-24                  |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

'&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

14 February 1996

23.02.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Benz, K

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 95/01495

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| Y        | JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH,<br>vol. 4, no. 3, November 1994 MONZICELLO<br>(US),<br>pages 1075-1090, XP 000476607<br>K.M. HUI ET AL. 'induction of<br>alloreactive cytotoxic T lymphocytes by<br>intra-splenic immunization with allogeneic<br>class I Major Histocompatibility complex<br>DNA and Dc-chol cationic liposomes'<br>see the whole document<br>--- | 1-24                  |
| Y        | WO,A,93 14744 (CHIRON CORPORATION) 5<br>August 1993<br>see the whole document<br>---   | 1-24                  |
| A        | US,A,4 971 803 (LI ET AL.) 20 November<br>1990<br>see the whole document<br>see column 6; examples III-VI<br>---   | 1-4                   |
| A        | US,A,4 261 975 (FULLERTON ET AL.) 14 April<br>1981<br>see the whole document<br>-----  | 1-24                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/FR95/01495

### Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
**Remark:** Although Claims 21-23 are directed to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

### Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

#### Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 95/01495

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s)  | Publication date   |
|--|------------------|--|--|
| WO-A-9305162                           | 18-03-93         | US-A- 5283185<br>AU-B- 665029<br>AU-B- 2656592<br>CA-A- 2116676<br>EP-A- 0663013<br>JP-T- 7500963  | 01-02-94<br>14-12-95<br>05-04-93<br>18-03-93<br>19-07-95<br>02-02-95   |
| EP-A-0356339                           | 28-02-90         | AT-T- 119037<br>AT-T- 113472<br>AU-B- 631377<br>CA-A- 1334165<br>CA-A- 1337332<br>DE-D- 68919173<br>DE-T- 68919173<br>DE-D- 68921389<br>DE-T- 68921389<br>EP-A- 0356340<br>EP-A- 0626169<br>ES-T- 2069600<br>ES-T- 2063154<br>JP-T- 4500203<br>WO-A- 9001947<br>WO-A- 9001948<br>US-A- 5100662 | 15-03-95<br>15-11-94<br>26-11-92<br>31-01-95<br>17-10-95<br>08-12-94<br>09-03-95<br>06-04-95<br>29-06-95<br>28-02-90<br>30-11-94<br>16-05-95<br>01-01-95<br>16-01-92<br>08-03-90<br>08-03-90<br>31-03-92 |
| WO-A-9314744                           | 05-08-93         | AU-B- 3614493  | 01-09-93   |
| US-A-4971803                           | 20-11-90         | NONE   |  |
| US-A-4261975                           | 14-04-81         | NONE   |  |

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Internationale No  
PCT/FR 95/01495A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 A61K9/127 A61K47/28 A61K39/39

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
|-------------|--|-------------------------------|
| Y           | WO,A,93 05162 (THE UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH CORPORATION) 18 Mars 1993<br>voir le document en entier<br>& US,A,5 283 185<br>cité dans la demande<br>--- | 1-24                          |
| Y           | EP,A,0 356 339 (THE LIPOSOME COMPANY, INC.) 28 Février 1990<br>voir page 6, ligne 63 - page 11, ligne 56<br>---  | 1-24<br>-/-                   |

 Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- 'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- 'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- 'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- '&' document qui fait partie de la même famille de brevets

|   |  |
|---|--|
| Date à laquelle la recherche internationale a été efficacement achevée<br><br>14 Février 1996 | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale<br><br>23.02.96 |
|---|--|

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Benz, K

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Internationale No

PCT/FR 95/01495

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Categorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| Y         | JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH,<br>vol. 4, no. 3, Novembre 1994 MONZICELLO<br>(US),<br>pages 1075-1090, XP 000476607<br>K.M. HUI ET AL. 'induction of<br>alloreactive cytotoxic T lymphocytes by<br>intra-splenic immunization with allogeneic<br>class I Major Histocompatibility complex<br>DNA and Dc-chol cationic liposomes'<br>voir le document en entier<br>--- | 1-24                          |
| Y         | WO,A,93 14744 (CHIRON CORPORATION) 5 Août<br>1993<br>voir le document en entier<br>---   | 1-24                          |
| A         | US,A,4 971 803 (LI ET AL.) 20 Novembre<br>1990<br>voir le document en entier<br>voir colonne 6; exemples III-VI<br>---   | 1-4                           |
| A         | US,A,4 261 975 (FULLERTON ET AL.) 14 Avril<br>1981<br>voir le document en entier<br>-----  | 1-24                          |

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

de la demande internationale n°

PCT/FR 95/01495

### Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1.  Les revendications n°<sup>s</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:  
Remarque: Bien que les revendications 21-23 concernant und méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés à la composition.
2.  Les revendications n°<sup>s</sup> se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3.  Les revendications n°<sup>s</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

### Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1.  Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2.  Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3.  Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°<sup>s</sup>:
4.  Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°<sup>s</sup>;

Remarque quant à la réserve\*

Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.  
 Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Annonce nationale No  
PCT/FR 95/01495

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s)  |  | Date de<br>publication   |
|---|------------------------|--|--|--|
| WO-A-9305162                                    | 18-03-93               | US-A- 5283185<br>AU-B- 665029<br>AU-B- 2656592<br>CA-A- 2116676<br>EP-A- 0663013<br>JP-T- 7500963  |  | 01-02-94<br>14-12-95<br>05-04-93<br>18-03-93<br>19-07-95<br>02-02-95   |
| EP-A-0356339                                    | 28-02-90               | AT-T- 119037<br>AT-T- 113472<br>AU-B- 631377<br>CA-A- 1334165<br>CA-A- 1337332<br>DE-D- 68919173<br>DE-T- 68919173<br>DE-D- 68921389<br>DE-T- 68921389<br>EP-A- 0356340<br>EP-A- 0626169<br>ES-T- 2069600<br>ES-T- 2063154<br>JP-T- 4500203<br>WO-A- 9001947<br>WO-A- 9001948<br>US-A- 5100662 |  | 15-03-95<br>15-11-94<br>26-11-92<br>31-01-95<br>17-10-95<br>08-12-94<br>09-03-95<br>06-04-95<br>29-06-95<br>28-02-90<br>30-11-94<br>16-05-95<br>01-01-95<br>16-01-92<br>08-03-90<br>08-03-90<br>31-03-92 |
| WO-A-9314744                                    | 05-08-93               | AU-B- 3614493  |  | 01-09-93   |
| US-A-4971803                                    | 20-11-90               | AUCUN  |  |  |
| US-A-4261975                                    | 14-04-81               | AUCUN  |  |  |